

Requested Patent: FR2786104A1

Title:

TREATMENT OF HEMATOLOGICAL OR SOLID TUMORS USING AN INHIBITOR OF  
THE ACTIVATION OF NUCLEAR FACTOR-KAPPA B, PARTICULARLY TO  
PREVENT DEVELOPMENT OF RESISTANCE TO CHEMOTHERAPEUTICS ;

Abstracted Patent: FR2786104 ;

Publication Date: 2000-05-26 ;

Inventor(s): HAEFFNER ASTRID;; HIRSCH FRANCOIS ;

Applicant(s): CENTRE NAT RECH SCIENT (FR) ;

Application Number: FR19980014858 19981125 ;

Priority Number(s): FR19980014858 19981125 ;

IPC Classification:

A61K38/27; A61K38/18; A61K38/19; A61K31/7008; A61K31/475; A61K31/337;  
C12N15/16; A61P35/00 ;

Equivalents: AU1564300, EP1131088 (WO0030587), A3, WO0030587 ;

ABSTRACT:

Use of an inhibitor (I) of the activation of nuclear factor-kappaB (II) to produce a pharmaceutical for: (i) treatment of malignant hemopathy or solid tumors; and (ii) preventing development of, or to treat, resistance to cytotoxins (III) being used in treatment of such diseases, where (III) is an activator of (II). An Independent claim is also included for products containing (I) and (III) for simultaneous, separate or sequential administration in treatment of malignant hemopathy or solid tumors.

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①⑪ N° de publication : 2 786 104

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : 98 14858

⑤① Int Cl<sup>7</sup> : A 61 K 38/27, A 61 K 38/18, 38/19, 31/70, 31/475, 31/  
337, C 12 N 15/16, A 61 P 35/00

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 25.11.98.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 26.05.00 Bulletin 00/21.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du  
présent fascicule

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement  
public à caractère scientifique et technologique — FR.

⑦② Inventeur(s) : HIRSCH FRANCOIS et HAEFFNER  
ASTRID.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMA-  
CHY SARL.

⑤④ INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF-KB, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES.

⑤⑦ La présente invention a pour objet l'utilisation d'inhibi-  
teurs du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, dans le cadre du traite-  
ment de cancers, et plus particulièrement d'hémopathies  
malignes ou de tumeurs solides, ainsi que les produits con-  
tenant un composé inhibiteur de l'activation de NF- $\kappa$ B et  
une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur  
NF- $\kappa$ B, en tant que préparation de combinaison pour une  
utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour  
le traitement desdites pathologies.

FR 2 786 104 - A1



## INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF- $\kappa$ B, ET LEURS UTILISATIONS PHARMACEUTIQUES

---

5        La présente invention a pour objet l'utilisation d'inhibiteurs biologiques de NF- $\kappa$ B, dans le cadre du traitement de cancers, et plus particulièrement d'hémopathies malignes ou de tumeurs solides.

10        De nombreuses cellules tumorales ont développé des mécanismes sophistiqués leur permettant de résister à l'effet de certains agents utilisés en chimiothérapie anticancéreuse. Une des parades actuelles développées par les cliniciens est l'augmentation du dosage de ces médicaments, avec pour  
15        conséquence une aggravation des effets secondaires observés chez les patients. Ainsi par exemple, la plupart des leucémies et certains lymphomes sont traités par l'administration d'anthracyclines (daunomycine, dauxorubicine) dont la toxicité se manifeste sur des fonctions vitales (hépatique, cardiaque...)  
(Gauthier, PH, 1987, Gaz Med Fr, 94:43-49).

20        Le mécanisme d'action de ces médicaments a été bien étudié et aboutit essentiellement à la mort des cellules tumorales par apoptose (Hannun YA, Blood, 89:1845-1853). Pour échapper à l'apoptose, les cellules utilisent une catégorie de protéines codées par des gènes dénommés *multidrug resistant genes* (MDR) qui leur permettent de contrôler l'entrée ou la sortie de différentes molécules (Pastan I, Gottesman MM, 1991, Annu Rev Med, 42:277-286). Dans le cas des agents anticancéreux, ceux-ci sont évacués activement par l'intermédiaire de la P-glycoprotéine (P-gp), produit du gène *MDR1*.

25        Comme tout gène, l'expression des *MDR* est contrôlée par différents facteurs nucléaires. Ainsi, il a été récemment montré que le gène *MDR1* possédait dans sa partie régulatrice des sites de fixation du facteur NF- $\kappa$ B (Zhou G, Kuo MT, 1997, J Biol Chem, 272:15174-15183). Ce facteur nucléaire, qui par ailleurs joue un rôle considérable dans de nombreuses situations inflammatoires (Barnes PJ, Karin M, 1997, N Engl J Med, 336:1066-1071)  
30        participerait à l'activation du gène *MDR1*.

35        Plusieurs travaux récents ont établi un lien entre l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B et la potentialisation de l'apoptose. Dans les premières expériences rapportées (Wang CY et coll., 1996, Science, 272:784-786, Van Antwerp DJ et coll., 1996, Science, 272:787-789) les auteurs ont validé leurs données en utilisant des lignées manipulées génétiquement pour obtenir l'inhibition ou la

surexpression de l'activité NF- $\kappa$ B. Ceci ne permet donc pas d'en tirer directement des applications thérapeutiques.

5 Dans une autre étude, les auteurs ont testé les effets de différents inhibiteurs de protéases empêchant l'activation de NF- $\kappa$ B (pyrrolidine dithiocarbamate, *N*-tosyl-L-lysyl chlorométhylcétone, *N*-acétyl cystéine) sur une lignée de macrophages murins (Mannick EE et coll., 1997, *Mediators of Inflammation*, 6:225-232). Les auteurs de cet article concluent sur le lien possible entre l'inhibition de NF- $\kappa$ B et l'induction de l'apoptose des cellules inflammatoires et immunes.

10 Enfin, une autre approche axée sur l'inhibition des effets inflammatoires de NF- $\kappa$ B, a consisté à surexprimer l'inhibiteur naturel de NF- $\kappa$ B, la molécule I $\kappa$ B, par thérapie génique (Makarov SS et coll., 1997, *Gene Ther*, 4:846-852). Cette technologie est encore au stade de développement du fait de la complexité de la vectorisation nécessaire à son bon fonctionnement.

15 La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs de nouveaux effets de l'hormone de croissance humaine (hGH), dénommée également somatotropine, à savoir d'une part que l'hGH, et autres composés se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I, sont des inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B par une molécule cytotoxique, et, 20 d'autre part que l'hGH, et autres composés susmentionnés, permettent de potentialiser les effets de molécules cytotoxiques et donc de réduire les concentrations de ces dernières dans le cadre de traitements thérapeutiques.

Tout d'abord, les Inventeurs ont observé que les monocytes humains répondaient moins à une stimulation par les lipopolysaccharides (LPS) quand ils 25 étaient cultivés en présence d'hGH recombinante exogène. Les Inventeurs en ont conclu que l'hGH inhibait l'activation de NF- $\kappa$ B après stimulation par les LPS (Haeffner A et coll., 1997, *J Immunol*, 158:1310-1314).

Puis, les Inventeurs ont mis en évidence que les monocytes humains mouraient après le pontage (ou l'engagement) de la molécule de surface 30 APO1/CD95/Fas, et ont montré que l'hGH diminue la mort médiée à travers la molécule Fas, en augmentant la synthèse d'un proto-oncogène antiapoptogène, Bcl-2.

Enfin, les Inventeurs ont étudié les effets de l'hGH sur la réponse au TNF- $\alpha$  car Fas et le récepteur p55 du TNF- $\alpha$  appartiennent à la même famille 35 des récepteurs de croissance nerveuse. La lignée leucémique promyéloïde humaine U937 a été utilisé pour réaliser ce travail, du fait de l'insensibilité des monocytes humains à la mort médiée par le TNF- $\alpha$ . L'obtention de résultats

inverses à ceux observés avec Fas, à savoir que l'hGH accélère la mort des cellules médiée par le TNF- $\alpha$ , a permis aux Inventeurs de conclure sur l'effet inhibiteur de l'hGH sur l'activation de NF- $\kappa$ B par le TNF- $\alpha$  ou par d'autres molécules cytotoxiques activant NF- $\kappa$ B, telle que la daunomycine.

5           Ainsi, la présente invention a pour but de fournir une nouvelle méthode de traitement des cancers, et plus particulièrement des hémopathies malignes et des tumeurs solides, offrant l'avantage d'améliorer à la fois la réponse des malades à certains traitements anticancéreux et également, potentiellement, l'état général du malade.

10           L'invention a également pour but de fournir de nouveaux produits destinés au traitement desdites pathologies, présentant à la fois l'avantage d'augmenter la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie, et celui d'améliorer l'état général des patients. Les nouveaux produits de l'invention permettent de diminuer l'activation du facteur NF- $\kappa$ B par l'intermédiaire du composé  
15           inhibiteur de l'activation de NF- $\kappa$ B utilisé, tel que l'hormone de croissance humaine, ce qui est susceptible d'entraîner l'inhibition de la transcription des gènes *MDR* et donc un renforcement des effets cytotoxiques des agents antitumoraux utilisés, avec pour conséquence attendue la diminution du dosage de ces médicaments antitumoraux.

20           L'invention a pour objet l'utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

            L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de composés inhibiteurs de NF- $\kappa$ B, pour la préparation de médicaments destinés à la  
25           prévention de l'apparition, ou au traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, ces phénomènes de résistance apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF- $\kappa$ B.

30           Par composés inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B (encore désignés composés inhibiteurs de NF- $\kappa$ B), on entend tout composé capable d'inhiber dans les cellules de l'organisme, l'activation de NF- $\kappa$ B faite par des molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, et donc tout composé capable d'inhiber la synthèse de protéines  
35           (telle que la P-gp) permettant aux cellules d'évacuer ces molécules avant qu'elles n'aient pu atteindre leurs cibles moléculaires.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B, en association avec une ou plusieurs molécules cytotoxiques utilisables dans le cadre du traitement des hémopathies malignes ou des tumeurs solides, lesdites molécules cytotoxiques étant susceptibles d'activer le facteur NF- $\kappa$ B.

Avantageusement, les composés inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B utilisés dans le cadre de la présente invention, sont des composés se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme. De préférence, lesdits composés sont choisis parmi ceux se liant aux récepteurs susmentionnés dont les séquences en acides aminés des parties transmembranaires, intracytoplasmiques et extramembranaires présentent une homologie d'environ 50 % à environ 70 %.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B tels que définis ci-dessus, choisis parmi l'hormone de croissance, la prolactine, l'érythropoïétine, l'interleukine-4, l'interleukine-7, le G-CSF, le GM-CSF, l'interleukine-3, l'interleukine-6, d'origine humaine ou autres mammifères.

De préférence, lesdits composés sont choisis parmi l'hormone de croissance, ou l'érythropoïétine.

A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée :

- de l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,
- ou, avantageusement, de l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B.

L'invention a plus particulièrement pour objet encore l'utilisation susmentionnée de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification..

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée, de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée de composés inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un médicament administrable par voie parentérale (IM, IV, SC), notamment à raison :

- d'environ 2 UI/kg de poids corporel/jour dans le cas de l'hormone de croissance humaine,
- d'environ 150 UI/kg de poids corporel/jour dans le cas de l'érythropoïétine humaine.

Parmi les molécules cytotoxiques susceptibles d'activer le facteur NF- $\kappa$ B utilisées en association avec lesdits composés inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,
- les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

Avantageusement, le dosage des molécules cytotoxiques utilisées en association avec lesdits composés est environ 2 à environ 5 fois inférieur au dosage de ces mêmes molécules utilisées seules dans le cadre du traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

A titre d'illustration :

- la posologie journalière usuelle de la daunomycine ou la dauxorubicine étant de 40 à 60 mg/m<sup>2</sup>, la posologie de ces dernières dans le cadre la présente invention est d'environ 5 à 30 mg/m<sup>2</sup>,

- la posologie journalière usuelle de la vinblastine étant de 5 à 7 mg/m<sup>2</sup>, la posologie de cette dernière dans le cadre la présente invention est d'environ 1 à 4 mg/m<sup>2</sup>,

5       - la posologie journalière usuelle de la vincristine étant de 1 à 2 mg/m<sup>2</sup>, la posologie de cette dernière dans le cadre la présente invention est d'environ 0,1 à 1 mg/m<sup>2</sup>,

- la posologie journalière usuelle du taxol étant d'environ 75 mg/m<sup>2</sup>, la posologie de ce dernier dans le cadre la présente invention est d'environ 15 à 35 mg/m<sup>2</sup>.

10       Parmi les cancers susceptibles d'être traités dans le cadre de la présente invention, on peut citer principalement :

- les hémopathies malignes telles que leucémies, lymphomes,
- les tumeurs solides telles que celles de l'ovaire, ou du sein.

L'invention a également pour objet tout produit contenant :

15       - un composé inhibiteur de l'activation de NF- $\kappa$ B tel que décrit ci-dessus, et plus particulièrement un composé se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I tels que définis ci-dessus,

- et une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- $\kappa$ B,

20       en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

L'invention a également pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, en tant que préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention de l'apparition, ou pour le traitement, de  
25       phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées, apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont susceptibles d'activer NF- $\kappa$ B.

L'invention concerne plus particulièrement tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de composé inhibiteur de  
30       l'activation de NF- $\kappa$ B, l'hormone de croissance, la prolactine, l'érythropoïétine, l'interleukine-4, l'interleukine-7, le G-CSF, le GM-CSF, l'interleukine-3, l'interleukine-6.

Des produits particulièrement préférés dans le cadre de la présente invention, sont ceux comprenant à titre de composé inhibiteur de l'activation de  
35       NF- $\kappa$ B, l'hormone de croissance, ou l'érythropoïétine.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend :



- l'hormone de croissance humaine telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,

5       - ou, avantageusement, l'hormone de croissance humaine recombinante telle que décrite ci-dessus, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par  
10 dégradation du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B.

15       L'invention a également pour objet tout produit tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que décrite ci-dessus, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par  
20 toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégradation du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4, et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B.

25       L'invention concerne également tout produit tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- $\kappa$ B, toute molécule choisie parmi les suivantes :

- 25       - les cytokines,  
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,  
- les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,  
- la paclitaxele (ou Taxol, DCI).

30       Des produits tels que définis ci-dessus préférés dans le cadre de la présente invention, sont caractérisés en ce qu'ils contiennent :

- 35       - l'hormone de croissance et la daunomycine ou la dauxorubicine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 5 à 30 mg/m<sup>2</sup> de daunomycine ou dauxorubicine,  
- l'hormone de croissance et la vinblastine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 1 à 4 mg/m<sup>2</sup> de vinblastine,

- l'hormone de croissance et la vincristine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 0,1 à 1 mg/m<sup>2</sup> de vincristine,

5       - l'hormone de croissance et le taxol, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 2 UI/kg d'hormone de croissance pour environ 15 à 35 mg/m<sup>2</sup> de taxol,

10       - l'érythropoïétine et la daunomycine ou la dauxorubicine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 5 à 30 mg/m<sup>2</sup> de daunomycine ou dauxorubicine,

      - l'érythropoïétine et la vinblastine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 1 à 4 mg/m<sup>2</sup> de vinblastine,

15       - l'érythropoïétine et la vincristine, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 0,1 à 1 mg/m<sup>2</sup> de vincristine,

      - l'érythropoïétine et le taxol, dans des proportions telles que leur posologie journalière est d'environ 150 UI/kg d'érythropoïétine pour environ 15 à 35 mg/m<sup>2</sup> de taxol.

20       L'invention est illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de l'effet *in vitro* de l'hormone de croissance sur des lignées cellulaires tumorales.

#### 1) Exemple n°1 :

25       Un gène de sélection (*neomycin resistant*, Neo<sup>R</sup>) et le gène codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH) ont été co-transfectés dans la lignée leucémique promyéloïde humaine U937. En comparant la lignée transfectée U937-hGH (qui produit de façon constitutive l'hGH à des doses physiologiques), soit à la lignée parentale U937, soit à une lignée transfectée avec Neo<sup>R</sup> seul, on observe par différentes approches méthodologiques que la  
30       lignée U937-hGH meurt davantage sous l'effet du *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ). Cette cytokine sécrétée par différents types de cellules immunes possède une activité antitumorale (Harakana, K et coll., 1984, Int J Cancer, 34:263-267) et est capable de promouvoir l'activation de NF-kB (Baeuerle PA, Henkel T, 1994, Ann Rev Immunol, 12:141-179).  
35

      Les cellules U937-hGH et les cellules contrôles U937-Neo ont été mises en culture pendant 48 heures en présence de concentrations croissantes de

TNF- $\alpha$  recombinant. A l'issue de cette culture, les cellules lavées ont été incubées en présence d'iodure de propidium qui s'incorpore dans l'ADN des cellules mortes. Les cellules sont analysées par cytométrie en flux.

5 La Figure n°1 montre l'augmentation de l'incorporation d'iodure de propidium en fonction des doses croissantes de TNF- $\alpha$  exprimées en unités internationales (UI). Pour les cellules U937 (lignée "mère" ayant servi à obtenir les lignées U937-hGH), avec l'augmentation de la concentration de TNF- $\alpha$  on observe une légère augmentation du pourcentage de cellules fluorescentes (donc mortes) due à l'incorporation d'iodure de propidium (fluorescence rouge). Cette figure met par contre bien en évidence le fait que ces valeurs sont beaucoup plus élevées pour la lignée U937-hGH, en fonction des doses croissantes de TNF- $\alpha$  ajoutées au milieu de culture.

10 Il est ainsi démontré que la présence dans les cultures cellulaires d'hGH produite par les lignées U937 transfectées avec le gène de l'hGH, augmente leur susceptibilité à l'induction de mort médiée par le TNF- $\alpha$ .

## 2) Exemple n°2 :

20 Ayant rapporté dans une étude précédente que l'hGH pouvait intervenir dans l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B médiée par les lipopolysaccharides (Haeflner A et coll., 1997, J Immunol, 158:1310-1314), les Inventeurs ont étudié le statut de NF- $\kappa$ B lors de la stimulation des différentes lignées par le TNF- $\alpha$ .

25 La Figure n°2 représente le résultat d'une analyse par gel retard. Sur ce gel ont été déposés des extraits nucléaires provenant des cellules U937-hGH et U937 (lignée "mère" ayant servi à obtenir les lignées U937-hGH) soumises à différents inducteurs dont le TNF- $\alpha$  ou le TNF- $\alpha$  et la cycloheximide (inhibiteur de synthèse protéique). Cette expérience indique clairement que la présence de NF- $\kappa$ B dans les noyaux des cellules U937-hGH est diminuée par rapport aux cellules contrôles.

30 La présence de NF- $\kappa$ B est attestée sur les lignes 4 et 5 qui représentent la migration des extraits nucléaires de cellules U937 stimulées par le TNF- $\alpha$ , et pré-incubés, soit avec une sonde froide NF- $\kappa$ B mutée qui ne déplace pas le signal (ligne 4), soit avec une sonde froide NF- $\kappa$ B homologue qui inhibe le signal (ligne 5).

35 La Figure n°3 représente le résultat d'un *enzyme immunoassay* (ELISA) réalisé avec le lysat de cellules U937-hGH et U937-Neo transfectées de façon

transitoire avec un plasmide contenant des séquences NF- $\kappa$ B dans le promoteur du gène rapporteur codant pour la chloramphenicol-acetyl-transférase (CAT) (Chiao P et coll., 1994, Proc Natl Acad Sci USA, 91:28-32).

5 Les cellules sont transfectées par électroporation puis incubées avec le TNF- $\alpha$ . A l'issue de la culture, les cellules sont lysées et l'activité CAT est mesurée par un ELISA commercial (Boehringer-Mannheim), selon les recommandations du fournisseur.

10 La figure montre que l'activité CAT, reflet de la présence de NF- $\kappa$ B, est diminuée dans les cellules U937-hGH par rapport aux cellules contrôles, après stimulation par le TNF- $\alpha$ .

Les résultats présentés dans les Figures 2 et 3 démontrent donc par deux approches méthodologiques différentes, que la synthèse de NF- $\kappa$ B est diminuée dans U937-hGH par rapport à la lignée contrôle.

15 3) Exemple n°3 :

L'utilisation du TNF- $\alpha$  étant très difficile en clinique humaine du fait des effets secondaires adverses, les Inventeurs se sont intéressés à la daunomycine. Cette anthracycline utilisée en thérapie anticancéreuse sous le nom de Cerubidine<sup>R</sup> agit en s'intercalant dans les séquences de l'ADN cellulaire, perturbant de ce fait le fonctionnement cellulaire. Tout comme le TNF- $\alpha$  (Baeuerle PA, Henkel T, 1994, Ann Rev Immunol, 12:141-179), la daunomycine active NF- $\kappa$ B (Das KC, White CW, 1997, J Biol Chem, 272:14914-14920).

25 La Figure 4 indique que la lignée U937-hGH est également plus sensible que la lignée contrôle à la mort médiée par la daunomycine.

4) Exemple n°4 :

30 Pour tester la possibilité d'utiliser l'objet de la présente invention sur des tumeurs non lymphoïdes, les Inventeurs ont utilisé l'hGH pour essayer d'inverser le phénotype "adriamycine résistant" de cellules isolées à partir d'un adénocarcinome ovarien humain IGROV/ADR (Bénard J et coll., 1985, Cancer Res, 45:4970-4979).

35 Comme illustré par la Figure 5, ces cellules sont insensibles à l'effet toxique de la daunomycine ajoutée à la culture (groupes hGH 0 ng/ml). L'adjonction d'hGH recombinante (Saizen<sup>R</sup>, laboratoire Serono) rend ces

cellules sensibles à la daunomycine, avec un effet maximal observé pour la plus faible dose d'hGH utilisée ici, soit 5 ng/ml.

Ce résultat prouve d'une part que des résultats d'aggravation de mortalité peuvent être obtenus aussi bien avec de l'hGH exogène recombinante qu'avec les lignées transfectées susmentionnées, et que d'autre part, la présente invention peut s'appliquer à des tumeurs solides non lymphoïdes.

#### Légendes des figures :

- Figure 1 : Effet de l'hormone de croissance sur la mortalité des cellules exposées au TNF- $\alpha$  : le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules de la souche U937-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules de la souche U937-hGH ; les concentrations de TNF- $\alpha$  sont indiquées en abscisse en UI/ml.

- Figure 2 : Effet de l'hormone de croissance sur la translocation de NF- $\kappa$ B ; la colonne 1 correspond aux cellules U937 de contrôle, la colonne 2 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- $\alpha$  + cycloheximide, la colonne 3 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- $\alpha$ , la colonne 4 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- $\alpha$  + une sonde NF- $\kappa$ B mutée, la colonne 5 correspond aux cellules U937 traitées par TNF- $\alpha$  + une sonde NF- $\kappa$ B homologue, la colonne 6 correspond aux cellules U937-hGH de contrôle, la colonne 7 correspond aux cellules U937-hGH traitées par TNF- $\alpha$  + cycloheximide, la colonne 8 correspond aux cellules U937-hGH traitées par TNF- $\alpha$  ; la présence de NF- $\kappa$ B est indiquée par une flèche.

- Figure 3 : Effet de l'hormone de croissance sur l'activité rapporteur CAT ; le pourcentage de variation de l'activité CAT est indiqué en abscisse ; les deux colonnes de gauche représentent les deux expériences effectuées sur les cellules U937-Neo, et les deux colonnes de droite représentent les deux expériences indépendantes effectuées sur les cellules U937-hGH.

- Figure 4 : Effet de l'hormone de croissance sur l'apoptose induite par la daunomycine ; le pourcentage des cellules mortes (IP+) est indiqué en ordonnée, les colonnes blanches correspondant aux cellules de la souche U937-Neo, les colonnes noires correspondant aux cellules de la souche U937-hGH ;

les pourcentages indiqués montrent l'augmentation de la mortalité des cellules ;  
les concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en  $\mu\text{M}$ .

- 5 - Figure 5 : Effet de l'hormone de croissance sur l'apoptose de la lignée  
IGROV/ADR, induite par la daunomycine ; le pourcentage des cellules mortes  
(IP+) est indiqué en ordonnée, les différentes colonnes correspondant aux  
différentes concentrations d'hGH utilisées (0, 5, 50, 500, 1000 ng/ml) ; les  
concentrations de daunomycine sont indiquées en abscisse en  $\mu\text{M}$ .

13  
LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

5

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

(B) RUE: 3, rue Michel-Ange

(C) VILLE: PARIS

10

(E) PAYS: FRANCE

(F) CODE POSTAL: 75794 CEDEX 16

(ii) TITRE DE L' INVENTION: INHIBITEURS DE L'ACTIVATION DE NF- $\kappa$ B, ET  
LEURS UTILISTIONS PHARMACEUTIQUES

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk

20

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

## 25 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 609 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

30

(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

35

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 1..609

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG GCT ACA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT GGC CTG CTC

48

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

45

1

5

10

15

TGC CTG CCC TGG CTT CAA GAG GGC AGT GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA

96

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu

20

25

30

50

TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT AGT CTC CGC GCC CAT CGT CTG CAC CAG

144

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln

35

40

45

55

14

CTG GCC TTT GAC ACC TAC CAG GAG TTT AAC CCC CAG ACC TCC CTC TGT	192
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys	
50 55 60	
5 TTC TCA GAG TCT ATT CCG ACA CCC TCC AAC AGG GAG GAA ACA CAA CAG	240
Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln	
65 70 75 80	
AAA TCC AAC CTA GAG CTG CTC CGC ATC TCC CTG CTG CTC ATC CAG TCG	288
10 Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser	
85 90 95	
TGG CTG GAG CCC GTG CAG TTC CTC AGG AGT GTC TTC GCC AAC AGC CTG	336
Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu	
15 100 105 110	
GTG TAC GGC GCC TCT GAC AGC AAC GTC TAT GAC CTC CTA AAG GAC CTA	384
Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu	
115 120 125	
20 GAG GAA GGC ATC CAA ACG CTG ATG GGG AGG CTG GAA GAT GGC AGC CCC	432
Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro	
130 135 140	
25 CGG ACT GGG CAG ATC TTC AAG CAG ACC TAC AGC AAG TTC GAC ACA AAC	480
Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn	
145 150 155 160	
TCA CAC AAC GAT GAC GCA CTA CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC	528
30 Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys	
165 170 175	
TTC AGG AAG GAC ATG GAC AAG GTC GAG ACA TTC CTG CGC ATC GTG CAG	576
Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln	
35 180 185 190	
TGC CGC TCT GTG GAG GGC AGC TGT GGC TTC TAG	609
Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe *	
195 200	

40

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

45

- (A) LONGUEUR: 203 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu  
 1 5 10 15

55 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu  
 20 25 30



15

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln  
 35 40 45

5 Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys  
 50 55 60

Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln  
 65 70 75 80

10 Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser  
 85 90 95

Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu  
 15 100 105 110

Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu  
 115 120 125

20 Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro  
 130 135 140

Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn  
 145 150 155 160

25 Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys  
 165 170 175

Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln  
 30 180 185 190

Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe \*

35 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 582 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: double  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (ix) CARACTERISTIQUE:  
 (A) NOM/CLE: CDS  
 (B) EMPLACEMENT: 1..582

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG GGG GTG CAC GAA TGT CCT GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC CTG  
 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Ser Leu  
 55 205 210 215

48

16																	
	CTG	TCG	CTC	CCT	CTG	GGC	CTC	CCA	GTC	CTG	GGC	GCC	CCA	CCA	CGC	CTC	96
	Leu	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Pro	Pro	Arg	Leu	
	220					225					230					235	
5	ATC	TGT	GAC	AGC	CGA	GTC	CTG	GAG	AGG	TAC	CTC	TTG	GAG	GCC	AAG	GAG	144
	Ile	Cys	Asp	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Leu	Glu	Ala	Lys	Glu	
					240					245						250	
	GCC	GAG	AAT	ATC	ACG	ACG	GGC	TGT	GCT	GAA	CAC	TGC	AGC	TTG	AAT	GAG	192
10	Ala	Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Gly	Cys	Ala	Glu	His	Cys	Ser	Leu	Asn	Glu	
				255					260						265		
	AAT	ATC	ACT	GTC	CCA	GAC	ACC	AAA	GTT	AAT	TTC	TAT	GCC	TGG	AAG	AGG	240
15	Asn	Ile	Thr	Val	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Asn	Phe	Tyr	Ala	Trp	Lys	Arg	
			270					275					280				
	ATG	GAG	GTC	GGG	CAG	CAG	GCC	GTA	GAA	GTC	TGG	CAG	GGC	CTG	GCC	CTG	288
	Met	Glu	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Val	Trp	Gln	Gly	Leu	Ala	Leu	
	285						290					295					
20	CTG	TCG	GAA	GCT	GTC	CTG	CGG	GGC	CAG	GCC	CTG	TTG	GTC	AAC	TCT	TCC	336
	Leu	Ser	Glu	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ser	Ser	
	300					305					310					315	
25	CAG	CCG	TGG	GAG	CCC	CTG	CAG	CTG	CAT	GTG	GAT	AAA	GCC	GTC	AGT	GGC	384
	Gln	Pro	Trp	Glu	Pro	Leu	Gln	Leu	His	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Gly	
					320					325					330		
	CTT	CGC	AGC	CTC	ACC	ACT	CTG	CTT	CGG	GCT	CTG	GGA	GCC	CAG	AAG	GAA	432
30	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Ala	Gln	Lys	Glu	
				335					340					345			
	GCC	ATC	TCC	CCT	CCA	GAT	GCG	GCC	TCA	GCT	GCT	CCA	CTC	CGA	ACA	ATC	480
35	Ala	Ile	Ser	Pro	Pro	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Leu	Arg	Thr	Ile	
			350					355					360				
	ACT	GCT	GAC	ACT	TTC	CGC	AAA	CTC	TTC	CGA	GTC	TAC	TCC	AAT	TTC	CTC	528
	Thr	Ala	Asp	Thr	Phe	Arg	Lys	Leu	Phe	Arg	Val	Tyr	Ser	Asn	Phe	Leu	
	365						370					375					
40	CGG	GGA	AAG	CTG	AAG	CTG	TAC	ACA	GGG	GAG	GCC	TGC	AGG	ACA	GGG	GAC	576
	Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ala	Cys	Arg	Thr	Gly	Asp	
	380					385				390					395		
45	AGA	TGA															582
	Arg	*															

50 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 194 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

55 (D) CONFIGURATION: linéaire

17

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

[illegible]

## REVENDEICATIONS

5 1. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation du facteur nucléaire  
κB (NF-κB), pour la préparation de médicaments destinés au traitement des  
hémopathies malignes et des tumeurs solides, et à la prévention de l'apparition,  
ou au traitement, de phénomènes de résistance aux molécules cytotoxiques  
utilisées dans le cadre du traitement des pathologies susmentionnées,  
apparaissant chez les patients traités par ces molécules lorsque ces dernières sont  
10 susceptibles d'activer NF-κB.

2. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF-κB selon la  
revendication 1, pour la préparation de médicaments destinés au traitement des  
hémopathies malignes et des tumeurs solides, en association avec une ou  
15 plusieurs molécules cytotoxiques utilisables dans le cadre du traitement des  
pathologies susmentionnées et susceptibles d'activer le facteur NF-κB.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, de composés  
inhibiteurs de l'activation de NF-κB se liant spécifiquement aux récepteurs  
20 transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme,  
tels que les composés choisis parmi l'hormone de croissance ou  
l'érythropoïétine.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 :  
25 - de l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à  
partir d'extraits hypophysaires, et purification,  
- ou de l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée  
par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence  
nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et  
30 étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la  
séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de  
croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de  
vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus,  
récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et  
35 purification,  
- ou de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression  
et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2,

et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 :

- 5       - de l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la  
séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique  
dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant  
néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en  
acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant  
10 obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant  
une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la  
protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.,  
- ou de toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression  
et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4,  
15 et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de  
NF- $\kappa$ B.

6. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B selon  
l'une des revendications 1 à 5, en association avec une ou plusieurs molécules  
20 cytotoxiques susceptibles d'activer le facteur NF- $\kappa$ B choisies parmi :

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,
- les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- la paclitaxele (ou Taxol, DCD).

25

7. Utilisation de composés inhibiteurs de l'activation de NF- $\kappa$ B selon  
l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le dosage des molécules  
cytotoxiques utilisées en association avec lesdits composés est environ 2 à  
environ 5 fois inférieur au dosage de ces mêmes molécules utilisées seules dans  
30 le cadre du traitement des hémopathies malignes et des tumeurs solides.

8. Produits contenant un composé inhibiteur de l'activation de NF- $\kappa$ B et  
une molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- $\kappa$ B, en tant que  
préparation de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée  
35 dans le temps pour le traitement des hémopathies malignes et des tumeurs  
solides.

9. Produit selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de composé inhibiteur de l'activation de NF- $\kappa$ B, un composé se liant spécifiquement aux récepteurs transmembranaires des cytokines de classe I dans les cellules de l'organisme, choisi notamment parmi l'hormone de croissance ou l'érythropoïétine.

10. Produit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'hormone de croissance humaine, telle qu'obtenue par extraction à partir d'extraits hypophysaires, et purification,
- ou l'hormone de croissance humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 1, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'hormone de croissance humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 2, ladite hormone de croissance étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification,
- ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 2, et conservant la propriété de l'hormone de croissance humaine d'inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B.

11. Produit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce qu'il comprend:

- l'érythropoïétine humaine recombinante telle que codée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO 3, ou par toute séquence nucléotidique dérivée de cette dernière par dégénérescence du code génétique et étant néanmoins capable de coder pour l'érythropoïétine humaine dont la séquence en acides aminés est représentée par SEQ ID NO 4, ladite érythropoïétine étant obtenue par transformation de cellules appropriées à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique telle que décrite ci-dessus, récupération de la protéine recombinante produite par lesdites cellules, et purification.,
- ou toute séquence peptidique dérivée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés de la séquence SEQ ID NO 4,

et conservant la propriété de l'érythropoïétine humaine d'inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B.

5        12. Produit selon l'une des revendications 8 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend à titre de molécule cytotoxique susceptible d'activer le facteur NF- $\kappa$ B, toute molécule choisie parmi les suivantes :

- les cytokines,
- les anthracyclines, dont la daunomycine, la dauxorubicine,
- les vinca-alcaloïdes, telles que la vinblastine et la vincristine,
- 10        - la paclitaxele (ou Taxol, DCD).

1/5

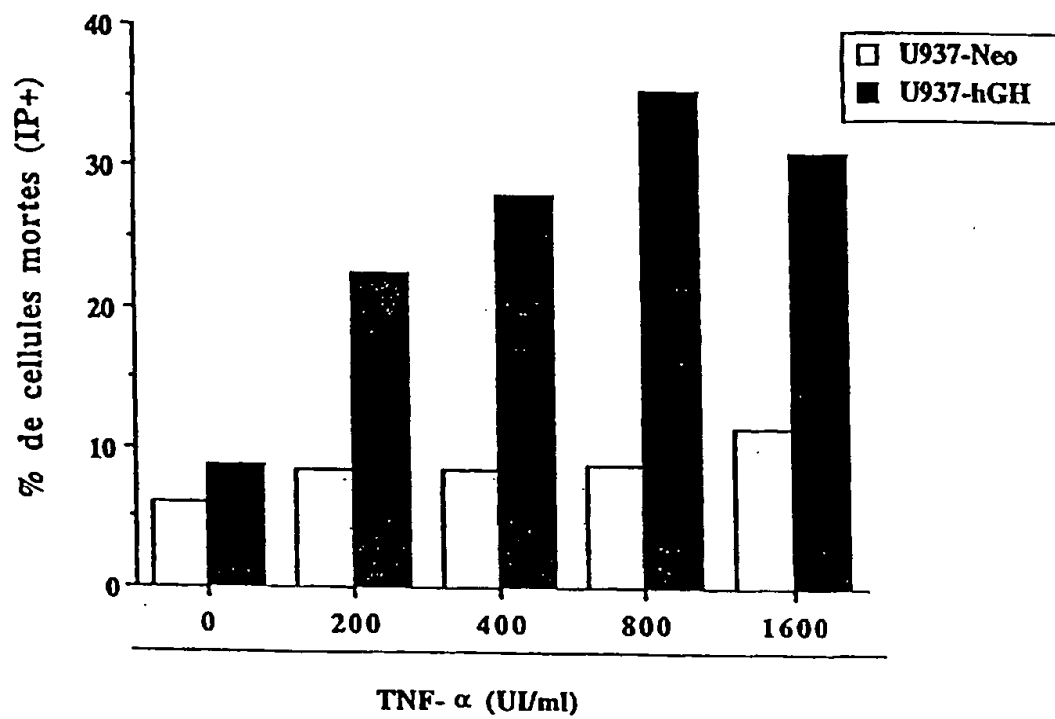


FIGURE 1



2/5

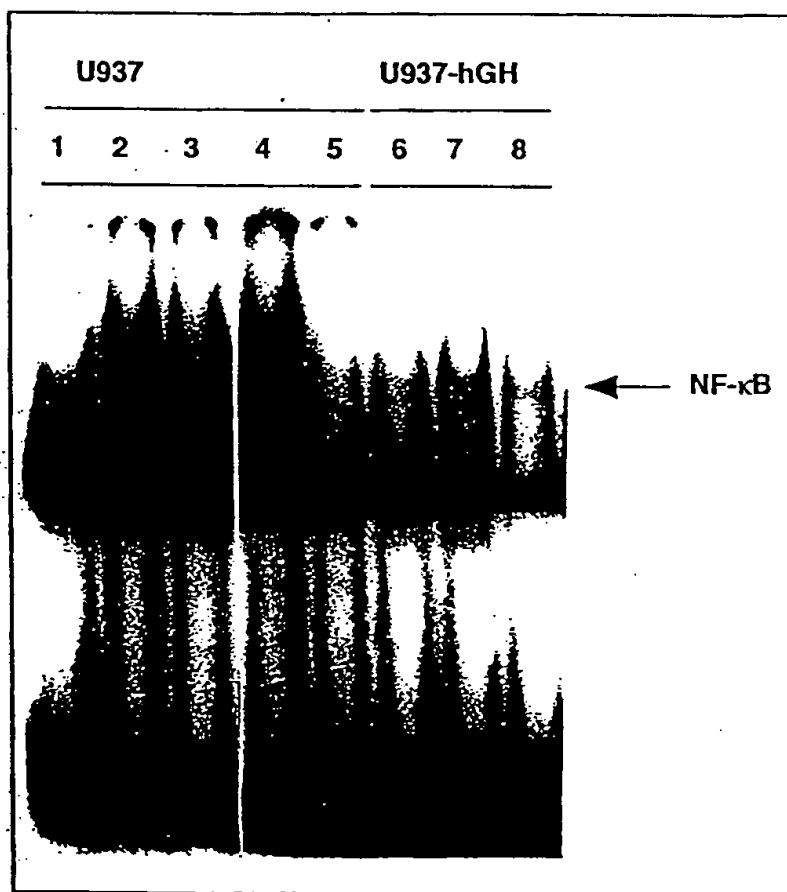


FIGURE 2

3/5

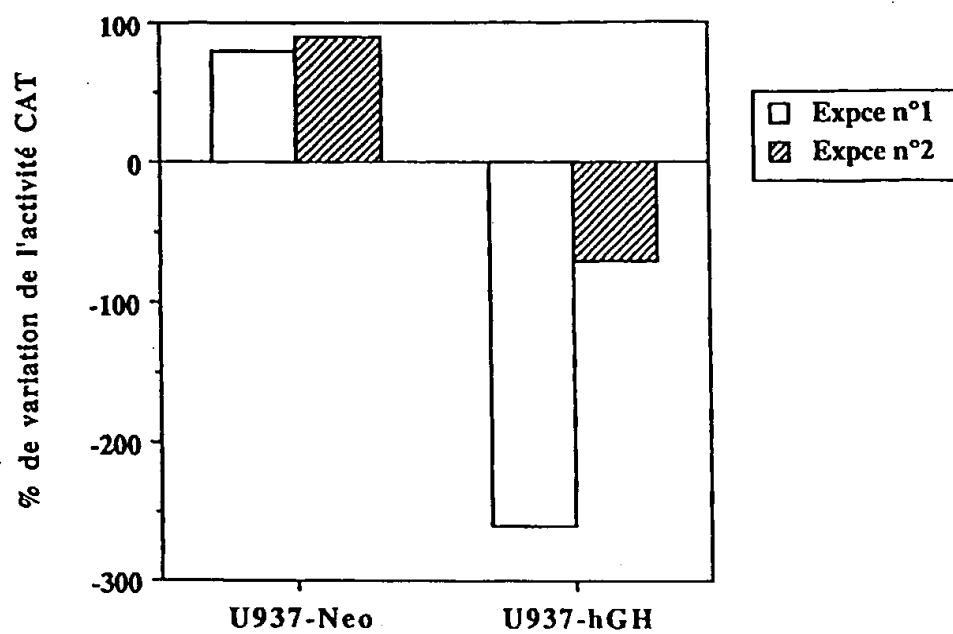


FIGURE 3

4/5

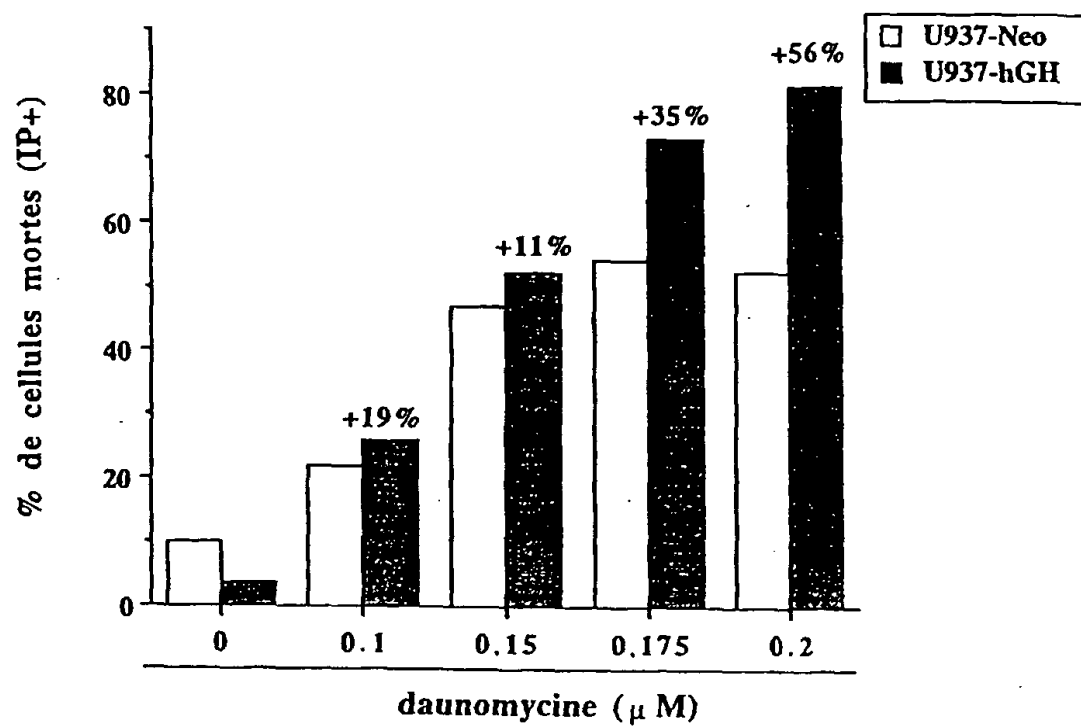


FIGURE 4

5/5

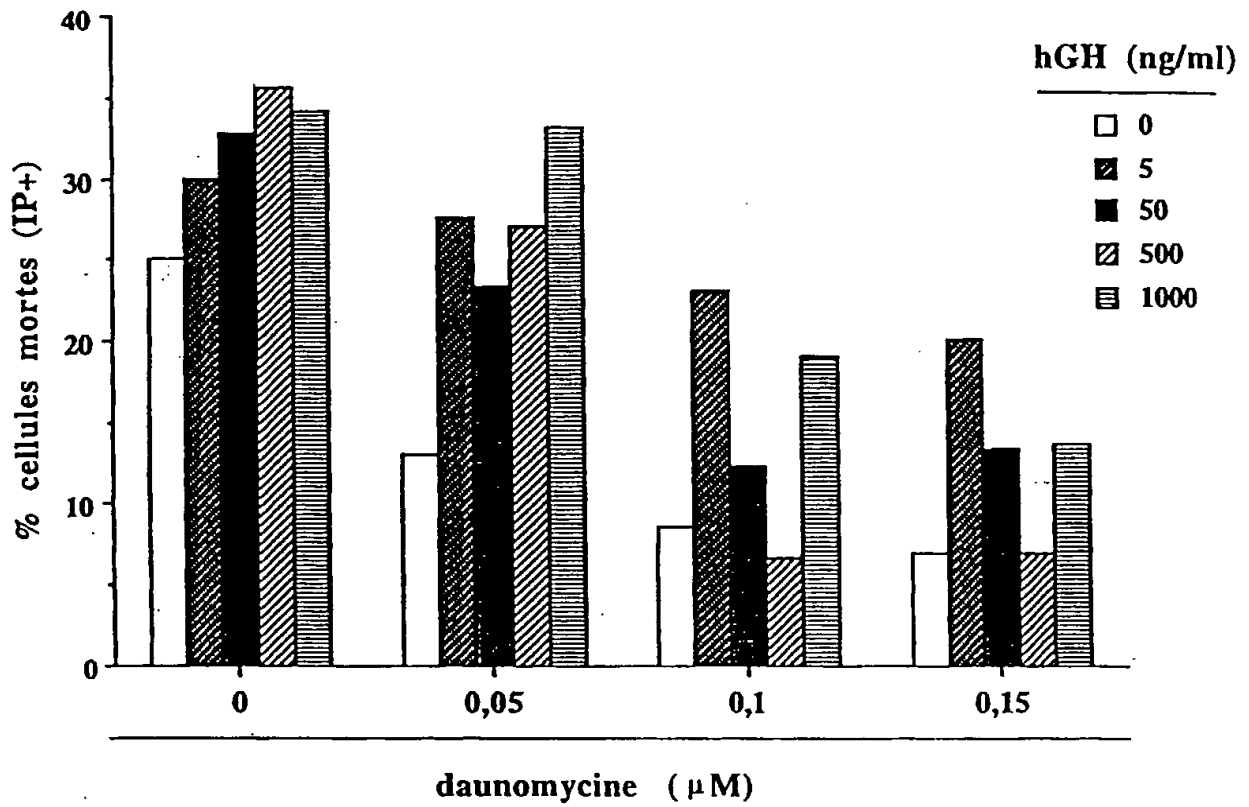


FIGURE 5

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 570216  
FR 9814858

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	DIGICAYLIOGLU, MURAT ET AL: "Neuroprotection from nitric oxide by erythropoietin ( EPO ) is mediated by NFkappaB." SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, (1998) VOL. 24, NO. 1-2, PP. 1792. MEETING INFO.: 28TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, PART 2 LOS ANGELES, CALIFORNIA, USA NOVEMBER 7-12, 1998 SOCIETY FOR NEUROSCIENCE. , XP002116163 * le document en entier *	1,2
D,A	HAEFFNER A ET AL: "Inhibitory effect of growth hormone on TNF-alpha secretion and nuclear factor -kappaB translocation in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1997 FEB 1) 158 (3) 1310-4. , XP002116164 * le document en entier *	1-12
D,A	WANG C Y ET AL: "TNF- $\alpha$ cancer therapy-induced apoptotic potentiation by inhibition of NF-kappaB see comments!." SCIENCE, (1996 NOV 1) 274 (5288) 784-7. , XP002116165 * le document en entier *	1-12
E	WO 99 06040 A (BERRY C. ET AL) 11 février 1999 (1999-02-11) * page 32 - page 35 *	1,2
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
22 septembre 1999		Moreau, J
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		